

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

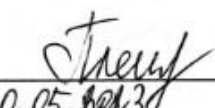
Кафедра биохимии и биофизики

**БИОТЕСТИРОВАНИЕ КАК ЧАСТЬ КОМПЛЕКСНОГО
ЭКОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА ПОЧВ ГОРОДА КОГАЛЫМА**


АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

студентки 4 курса 421 группы
направления 06.03.01 Биология
Биологического факультета
Мурзиной Анастасии Евгеньевны

Научный руководитель:
профессор кафедры биохимии
и биофизики, док.биол.наук


30.05.2023г. Е.В. Плешакова

Зав. кафедрой биохимии и биофизики,
профессор, док.биол.наук


30.05.2023г. С.А. Коннова

Саратов 2023

Введение. Необходимость проведения оценки экологического состояния урбанизированных экосистем в современном мире объясняется постоянным ростом и развитием различного рода промышленных предприятий, в том числе нефтедобывающих с последующей обработкой и транспортировкой углеводородной продукции. В этой связи возникает серьезная геохимическая угроза для экосистем в случае загрязнения почвы нефтепродуктами, т.к. в сырой нефти и буровых растворах присутствует ряд тяжелых металлов (ТМ): свинец, никель, кадмий, хром, ванадий и цинк [1]. ТМ непосредственно влияют на численность и видовое разнообразие почвенной микробиоты, оказывая мутагенный, микростатический и стерилизующий эффекты, а также нарушают правильную последовательность биохимических путей в биогеохимических циклах почвы [2].

Комплексная оценка эколого-функционального состояния почв нефтедобывающих районов является одной из приоритетных задач в современной природоохранной сфере, решение которой необходимо для обеспечения устойчивого функционирования и восстановления нарушенных экосистем.

Цель настоящей работы состояла в оценке экологического состояния почв города Когалыма Ханты-Мансийского автономного округа (ХМАО), Тюменской области методом биотестирования в сочетании с исследованием эколого-геохимических и микробиологических показателей в рамках проведения комплексного экологического мониторинга.

Для реализации поставленной цели решались следующие задачи:

1. Осуществить биотестирование почв на территории г. Когалыма с помощью метода, основанного на определении дегидрогеназной активности микробного штамма *Dietzia maris* AM3.

2. Оценить степень токсичности почв на территории г. Когалыма в сравнении с показателями биотестирования фоновых (контрольных) проб.

3. С помощью корреляционного анализа провести сравнительную оценку взаимосвязей между эколого-геохимическими, микробиологическими показателями и показателями биотестирования почв г. Когалыма.

4. Оценить экологическое состояние почв города Когалыма с помощью комплексного подхода, основанного на анализе эколого-геохимических, микробиологических показателей и показателей биотестирования.

В качестве объекта исследования использовались 53 почвенные пробы, отобранные на территории г. Когалыма. 10 фоновых проб были отобраны на удалении 10 км в западном направлении от территории города в идентичных городским геоморфологическим и геологическим условиям. Отбор почвенных проб производили сотрудники Центра исследования керна и пластовых флюидов Филиала ООО «ЛУКОЙЛ-Инжиниринг» «КогалымНИПИнефть» в г. Тюмени в июне 2021 г. в соответствии с ГОСТ 17.4.4.02-84 [3].

Для определения токсичности почвы использовался метод, основанный на способности ферментов дегидрогеназ восстанавливать за счет дегидрирования бесцветный 2,3,5-трифенилтетразолийхлорид (2,3,5-ТТХ) до темно-красного 2,3,5-трифенилформаза (2,3,5-ТФФ). Дегидрогеназы высоко чувствительны к действию токсичных веществ, в присутствии которых их активность снижается, что позволяет путем сравнения образованного количества ТФФ в опытах и контроле оценить степень токсичности исследуемых образцов почвы [4]. В качестве тест-организма использовался микробный штамм *D. maris* AM3, способный к деструкции как алкановых, так и ароматических углеводов, что предполагает у него наличие широкого спектра ферментов, в т.ч. дегидрогеназ [5].

Исследуемые почвенные пробы в количестве 1 г автоклавировали для инактивации почвенных ферментов. Затем согласно методике вносили в пробирки с почвой растворы в указанной последовательности: 1,2 мл Na_2HPO_4 ; 0,5 мл 0,1 М глюкозы; 0,1 мл 0,1 М MgSO_4 ; 0,2 мл 0,5 % 2,3,5-ТТХ; 1 мл бактериальной суспензии *D. maris* AM3 с оптической плотностью 0,5 ед.

Смесь инкубировали в термостате при $t = 28\text{ }^{\circ}\text{C}$ до появления темно-красной окраски 2,3,5-ТФФ. В качестве контроля готовили пробирки с субстратами и бактериальной суспензией без добавления почвы. Далее экстрагировали 2,3,5-ТФФ ацетоном, колориметрировали отфильтрованный экстракт.

Определение ТМ в почве проводили сотрудники Центра исследования керна и пластовых флюидов Филиала ООО «ЛУКОЙЛ-Инжиниринг» «КогалымНИПИнефть» (г. Тюмень) методом атомно-абсорбционной спектрометрии с пламенной атомизацией. Подвижные кислоторастворимые формы металлов (Cu, Zn, Ni, Pb) определяли в вытяжках 1М HNO₃ [6].

Микробиологические анализы почв осуществляли на кафедре микробиологии и физиологии растений биологического факультета ФГБОУ ВО «СГУ имени Н.Г. Чернышевского». Оценку общей численности культивируемых гетеротрофных микроорганизмов производили на ГРМ-агаре общепринятыми бактериологическими методами [7]. Учет численности культивируемых микроорганизмов азотного цикла производили на агаризованных селективных средах.

Бакалаврская работа включает содержание, список сокращений, введение, 3 главы (обзор литературы, материалы и методы, результаты исследований и их обсуждение), заключение, выводы и список использованных источников, включающий 77 источников на русском и английском языках. Работа изложена на 57 страницах машинописного текста. Работа проиллюстрирована 5 рисунками и 3 таблицами.

Основное содержание работы. В ходе проведенных экспериментов нами была проанализирована проанализирована степень токсичности почвы территории города Когалыма (Сургутский район ХМАО Тюменской области) при помощи определения дегидрогеназной активности микробного штамма *D. maris* AM3.

Результаты биотестирования показали, что количество 2,3,5-ТФФ, образованного дегидрогеназами тест-микроорганизма *D. maris* AM3, в 53 пробах почв на территории г. Когалыма варьировало от 0,159 до 0,755 мг/мл.

Нетоксичными оказались 11 из 53 проанализированных почвенных проб. Разница между опытными и контрольными цифрами составляла в данном случае менее 10%. Слабо токсичными оказались 15 проб (разница 10-30%). Почвенных проб средней токсичности (разница 30-50%) обнаружено в количестве 14 штук. 15 проб оказались с высокой степенью токсичности (разница >50%).

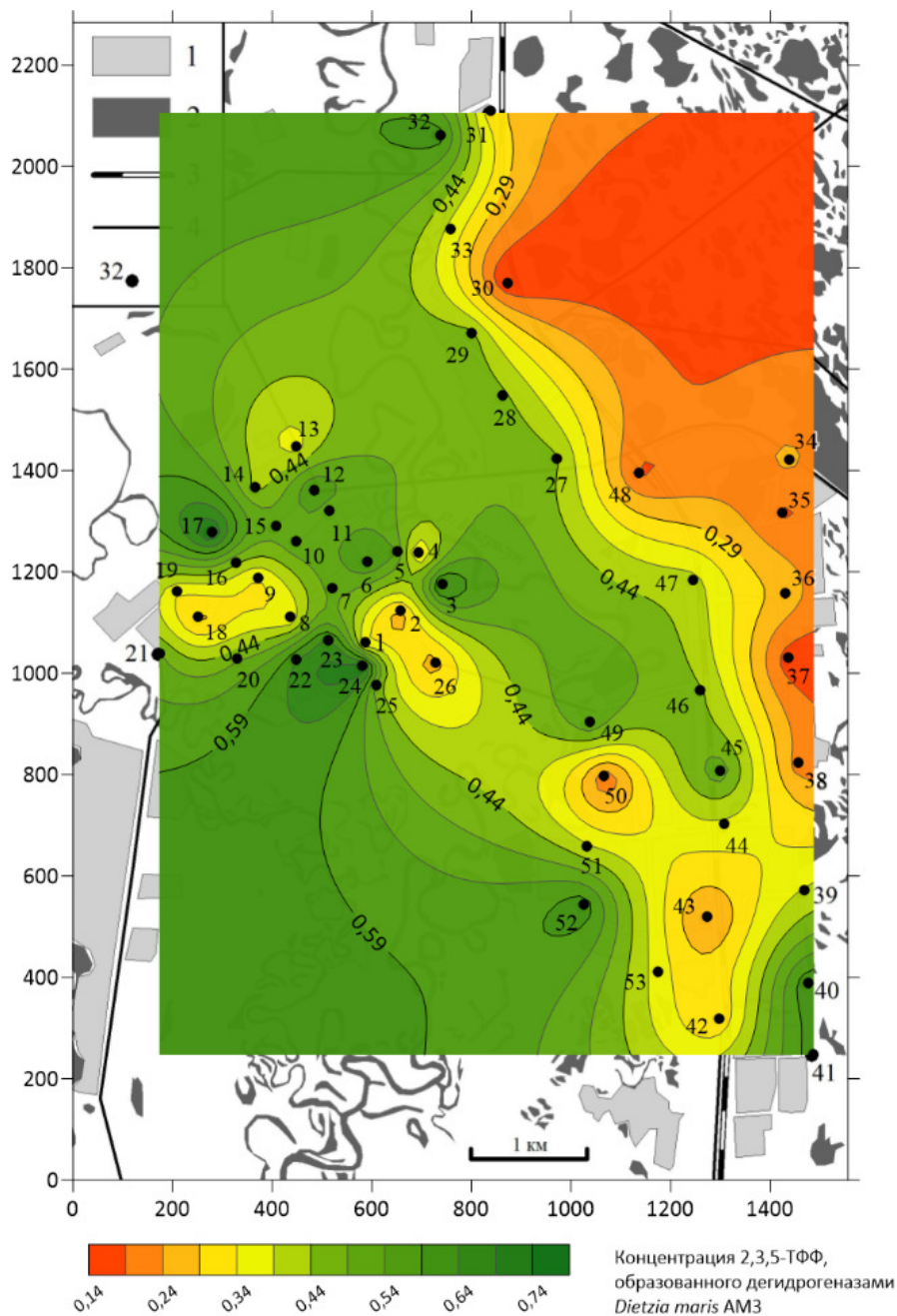


Рисунок 1 – Распределение показателя биотестирования почв г. Когалыма – концентрации 2,3,5-ТФФ, образованного дегидрогеназами *Dietzia maris* AM3

Наиболее сильное угнетение дегидрогеназной активности штамма *D. maris* AM3 было выявлено в четырех пробах, три из которых относятся к Восточной промышленной зоне (№35, 37 и 48), а четвертая проба № 30 была взята с территории Северной промышленной зоны.

Однако стоит отметить, как видно из рисунка 1, пробы с наименьшим количеством 2,3,5-ТФФ встречаются во всех трех городских зонах: селитебной, Северной и Восточной, но в Восточном промышленном районе таких проб больше всего.

Процентное соотношение токсичности почвы территории города Когалыма показывает, что высокой степенью токсичности обладают 27 % проанализированных почвенных проб, что в целом, свидетельствует об отсутствии высокой токсичности почвы (рисунок 2).

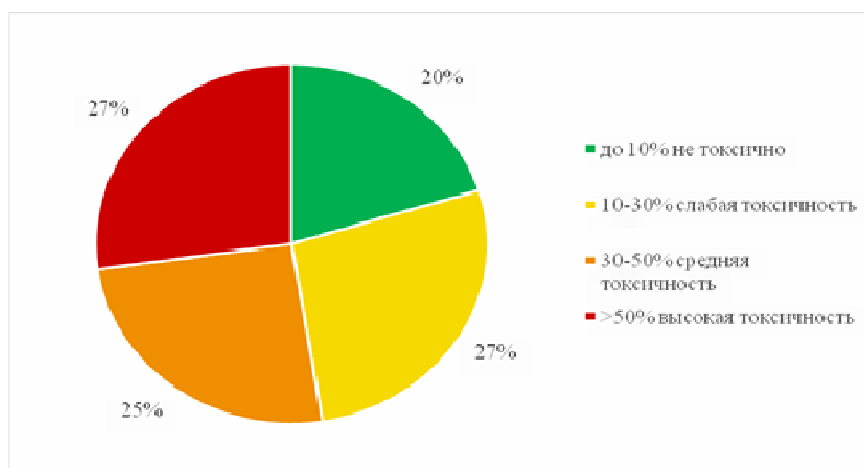


Рисунок 2 – Соотношение токсичности почвенных проб территории г. Когалыма

По данным проведенного геохимического анализа средняя концентрация подвижных форм ТМ в фоновых пробах была значительно ниже ПДК (в десятки и сотни раз), составляя: Cu и Ni – 0,18 мг/кг, Zn – 0,04 мг/кг; Pb – 0,61 мг/кг почвы.

Согласно представленным в таблице 1 данным, на исследованной территории г. Когалыма подвижные формы Cu превышали ПДК (3,0 мг/кг) в 12 пробах, подвижные формы Ni превышали ПДК (4,0 мг/кг) в 14 пробах. Выделялся Восточный промышленный район, в котором отмечено

превышение подвижных форм Cu и Ni над ПДК в большинстве проб. Подвижные формы Pb (от 0,08 до 2,93 мг/кг почвы) не превышали ПДК (6,0 мг/кг почвы) во всех пробах. Обнаружены подвижные формы Zn в концентрации от 1,76 до 26,01 мг/кг почвы. Только в 3 пробах концентрация подвижных форм Zn незначительно превышала ПДК (23,0 мг/кг почвы).

Таблица 1 – Результаты эколого-геохимического и микробиологического анализа почв г. Когалыма

Показатели	Минимальное значение	Максимальное значение	Среднее значение	Ст. откл. (S)
	Концентрация металла, мг/кг почвы			
C_{Ni}	0,24	8,73	2,96	0,50
C_{Cu}	0,16	11,55	2,60	0,55
C_{Pb}	0,08	2,93	0,99	0,13
C_{Zn}	1,76	26,01	12,15	2,60
Количество микроорганизмов, КОЕ/ г почвы				
ОЧГМ	$5,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^{10}$	$1,5 \times 10^5$	0,70
Число АФМ	$1,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^7$	$4,5 \times 10^5$	1,30
АММ	$2,0 \times 10^4$	$5,0 \times 10^{10}$	$1,9 \times 10^5$	0,95
ДНМ	$5,0 \times 10^3$	$5,0 \times 10^6$	$5,4 \times 10^4$	1,45

Примечание: С – концентрация металла; ОЧГМ – общая численность гетеротрофных микроорганизмов; АФМ – азотфиксирующие микроорганизмы; АММ – аммонифицирующие микроорганизмы; ДНМ – денитрифицирующие микроорганизмы.

Почвы г. Когалыма не отличались богатством гетеротрофных микроорганизмов по шкале Д. Г. Звягинцева (1978), очень обеднены ($<1 \times 10^6$ КОЕ/г почвы) и обеднены ($1-2 \times 10^6$ КОЕ/г почвы) бактериями-аммонификаторами; очень обеднены ($<1 \times 10^6$ КОЕ/г почвы) денитрифицирующими микроорганизмами, очень обеднены ($<2 \times 10^6$ КОЕ/г почвы) и обеднены ($2-4 \times 10^6$ КОЕ/г почвы) азотфиксирующими микроорганизмами (таблица 1).

Проведенный корреляционный анализ, результаты которого отражены в таблице 3, выявил значимую отрицательную корреляцию между количеством денитрифицирующих микроорганизмов и содержанием в почве ТМ: Ni и Cu ($r=-0,53$ и $r=-0,44$). Снижение количества денитрифицирующих микроорганизмов в микробценозах почв г. Когалыма по сравнению с

фоновой территорией и наличие достоверной обратной корреляции с содержанием подвижных форм Ni и Cu указывало на возможное негативное действие данных ТМ на развитие денитрификаторов.

Таблица 2 – Корреляция между геохимическими, микробиологическими свойствами почв и показателями биотестирования

Показатели	C _{Ni}	C _{Pb}	C _{Zn}	C _{Cu}	Концентрация 2,3,5-ТФФ	ОЧГМ	Численность		
							АФМ	АММ	ДНМ
C _{Ni}	1				-0,30*		-0,35*	-0,35*	-0,53*
C _{Pb}		1			0,20		0,36*	0,10	0,20
C _{Zn}			1		-0,33*		0,23	-0,38*	-0,33*
C _{Cu}				1	-0,21		-0,25	-0,32*	-0,44*
Концентрация 2,3,5-ТФФ					1	0,17	0,14	0,10	0,31*
ОЧГМ						1	0,32*	0,04	0,02
Численность АФМ						0,29	1	0,22	0,32*
АММ						0,84*		1	0,21
ДНМ						0,25			1

*Значимая корреляция, при r , соответствующем уровню статистической значимости при $p=0,05$. Сокращения: С – концентрация металла; ОЧГМ – общая численность гетеротрофных микроорганизмов; АФМ – азотфиксирующие микроорганизмы; АММ – аммонифицирующие микроорганизмы; ДНМ – денитрифицирующие микроорганизмы.

Слабая отрицательная корреляция была показана между дегидрогеназной активностью *D. maris* AM3 и концентрацией в почве подвижных форм ТМ (Cu, Ni и Zn): $r = -0,21$; $-0,30$ и $-0,33$; слабая положительная корреляция выявлена между дегидрогеназной активностью *D. maris* AM3 и количеством в почве денитрифицирующих микроорганизмов ($r = 0,31$).

Заключение: Проведенные нами исследования показывают, что почвы территории г. Когалыма слабо загрязненные и не представляют опасности для человека.

Однако стоит отметить, что биологические свойства городских почв постепенно изменяются, о чем говорит повышенная степень токсичности

почв согласно результатам биотестирования, а также максимально сниженное количество микроорганизмов азотного цикла: аммонифицирующих, денитрифицирующих и азотфиксирующих в почвах Восточной и Северо-Восточной промышленных зон города. Также наблюдается повышенное содержание подвижных форм меди и никеля. Такие изменения могут неблагоприятно сказываться на функционировании почвенного покрова как составной части урбаноэкосистемы. Состояние таких почв требует внимания и постоянного контроля, целесообразно регулярно проводить их комплексный мониторинг.

Полученные результаты биотестирования почв г. Когалыма являются важной частью комплексного экологического мониторинга, основой для последующей оценки и динамического наблюдения за экологическим состоянием урбосистемы, а также прогнозирования состояния антропогенно нарушенных территорий.

Выводы: 1. Результаты биотестирования показали, что количество 2,3,5-ТФФ, образованного дегидрогеназами тест-микроорганизма *D. maris* AM3, в 53 пробах почв на территории г. Когалыма варьировало от 0,159 до 0,755 мг/мл.

2. По результатам биотестирования установлено, что из 53 проанализированных почвенных проб, отобранных на территории г. Когалыма, 11 проб оказались нетоксичными, 15 проб – слаботоксичными, 14 проб характеризовались средней токсичностью, 15 проб – высокой токсичностью. Максимальная степень экотоксичности выявлена в пробах: № 30, 35, 37 и 48, расположенных в Восточной и Северо-Восточной промышленных зонах города.

3. Показана слабая отрицательная корреляция между дегидрогеназной активностью *D. maris* AM3 и концентрацией в почве подвижных форм Ni и Zn ($r=-0,30$ и $-0,33$); слабая положительная корреляция между

дегидрогеназной активностью *D. maris* AM3 и количеством в почве денитрифицирующих микроорганизмов ($r = 0,31$).

4. Комплексная оценка экологического состояния почв г. Когалыма показала, что в Восточной и Северной промышленных зонах города наблюдается наибольший уровень аккумуляции подвижных форм меди и никеля, максимально сниженное количество микроорганизмов азотного цикла: аммонифицирующих, денитрифицирующих и азотфиксирующих и высокая степень токсичности почвы по результатам биотестирования.

Список использованных источников

1 Oil spill related heavy metal: a review / A. D. Mustafa [et al.] // Malaysian Journal of Analytical Sciences. – 2015. – V. 19, N 6. – P. 1348-1360.

2 Friedlová, M. The influence of heavy metals on soil biological and chemical properties // Soil and Water Research. – 2010. – V. 5, N 1. – P. 21-27.

3 ГОСТ 17.4.4.02-84. Охрана природы. Почвы. Методы отбора и подготовки проб для химического, бактериологического, гельминтологического анализа : Межгосударственные стандарты. – М. : Стандартиформ, 2008. – 8 с.

4 Плешакова, Е. В. Разработка нового метода определения токсичности нефтезагрязненной почвы / Е. В. Плешакова // Вестник СГТУ. – 2010. – № 3. – С. 188-193.

5 Нефтеокисляющий штамм *Dietzia maris* и возможности его использования для биоремедиации загрязненной почвы / Е.В. Плешакова [и др.] // Вестник МГОУ. Серия Естественные науки. – 2010. – № 4. – С. 82-89.

6 РД 52.18.191-89. Методика выполнения измерений массовой доли кислоторастворимых форм металлов (меди, свинца, цинка, никеля, кадмия) в пробах почвы атомно-абсорбционным анализом. – М. : Государственной комитет СССР по гидрометеорологии, 1990.

7 Практикум по микробиологии / А. И. Нетрусов [и др.]. – М. : Академия, 2005. – 608 с.